 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.01.26 J South Med Univ, 2016, 36(1): 140-144

临床研究

精子DNA完整率、精子顶体完整率及反应率对补救卵泡浆内单精子注射术的影响

何泳志[1],李大文[2],成俊萍[2],霍仲超[3],黄红艺[2],肖 鑫[3]
[1]广西壮族自治区妇幼保健院生殖中心,南宁 530003;[2]广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心,南宁 530021;[3]广西中医药大学,南宁 530001

摘要:目的 探讨精子DNA完整率、精子顶体完整率及反应率对补救卵胞浆内单精子注射(ICSI)结局的影响。**方法** 回顾性分析我院生殖中心行常规试管受精(IVF)失败需行补救ICSI的97对不孕不育夫妇,根据妊娠情况分为妊娠组(41例)及未妊娠组(56例),分析两组患者精子DNA完整率(用精子DNA断裂指数DFI表示)、精子顶体完整率及反应率对ICSI结局的影响。**结果** 两组患者男方年龄、睾酮值、睾丸体积、FSH值、女方年龄、获卵数均无显著差异(P>0.05),但不育年限未妊娠组长于妊娠组,差异有统计学意义(P<0.05)。两组患者行补救ICSI时受精率及卵裂率无显著差异(P>0.05),但优胚率妊娠组高于未妊娠组,差异有统计学意义(P<0.05)。两组精子DNA完整率(DFI)、顶体反应率均无显著差异(P>0.05),但顶体完整率妊娠组高于未妊娠组,差异有统计学意义(P<0.05);精子DNA完整率、顶体完整率、顶体反应率分别与受精率、卵裂率、优胚率均无显著相关性(P>0.05)。补救ICSI临床妊娠率为42.3%,双胎率为10.3%,单胎率为32.0%。**结论** 补救ICSI是体外受精-胚胎移植受精失败后有效的补救方案,精子顶体完整率与其妊娠结局相关。
关键词:精子DNA完整率;精子顶体完整率;精子顶体反应率;补救卵胞浆内单精子注射

Impact of sperm DNA and acrosome integrity and acrosome reaction rate on outcomes of rescue intracytoplasmic sperm injection

HE Yongzhi[1], LI Dawen[2], CHENG Junping[2], HHUO Zhongchao[3], HUANG Hongyi[2], XIAO Xin[3]
[1]Reproductive Medicine Center, Maternal & Child Health of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530003, China; [2]Center for Reproductive Medicine and Genetics, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China; [3]Guangxi university of Chinese medicine, Nanning 530001, China

Abstract: Objective To explore the effects of sperm DNA integrity rate, acrosome integrity rate and acrosome reaction rate on the outcomes of rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Methods** This retrospective analysis was conducted among 97 infertile couples receiving rescue ICSI due to failure of *in vitro* fertilization procedures in our Reproductive Medicine Center. Of these 97 women, 41 had clinical pregnancy and 56 did not, and the effects of sperm DNA integrity rate (estimated by DNA fragmentation index, DFI), acrosome integrity rate and acrosome reaction rate on rescue ICSI outcomes were analyzed. **Results** No significant difference was found in paternal age, testosterone value, testicular volume, FSH, female patient' age or the number of eggs retrieved between the two groups (P>0.05), but the infertility years was significantly shorter in the pregnancy group than in the non-pregnancy group (P<0.05). The fertilization rate and cleavage rate were similar between the two groups (P>0.05), but the good embryo rate was significantly higher in the pregnancy group (P<0.05). The sperm DNA integrity or acrosome reaction rate did not differ significantly between the two groups (P>0.05), but the acrosome integrity rate was significantly higher in the pregnancy group (P<0.05). The sperm DNA integrity rate, acrosome integrity or acrosome reaction rate were not correlated with the fertilization rate, cleavage rate or good embryo rate (P>0.05). The pregnancy rate, twin and single fetus rates were 42.3%, 10.3% and 32.0% in this cohort after recue ICSI, respectively. **Conclusion** Rescue ICSI is an effective treatment after failed *in vitro* fertilization procedure, and sperm acrosome integrity rate is associated with the outcome of rescue ICSI.
Key words: sperm DNA integrity rate; sperm acrosome intact rate; sperm acrosome reaction rate; rescue intracytoplasmic sperm injection

在常规体外受精周期完成受精失败可能发生在10%~20%的不孕不育夫妇[1]。研究表明卵子受精通常在加入精子后2~4 h完成,授精6 h后大约90%的受精卵释放出第二极体(Pb2),未排第二极体意味着受精失败[2]。发生受精失败的原因可能有:精卵成熟不良,精子与卵子透明带结合障碍,配子融合障碍等[3]。为了克服

收稿日期:2015-08-22
基金项目:国家自然科学基金(81360107);广西医疗卫生适宜技术研究与开发课题(S201421-03)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81360107).
作者简介:何泳志,在读硕士研究生,E-mail: 308033462@qq.com
通信作者:李大文,教授,硕士研究生导师,主任医师,E-mail: Lidawendavid@aliyun.com

受精障碍，学者[4]提出了“补救卵胞浆内单精子注射(ICSI)技术”。Singh等[5]报告受精失败之后行补救ICSI最终得以妊娠，尽管补救ICSI技术仍然存在很多问题，但是却给受精失败的夫妇提供了妊娠的机会。由于行试管受精(IVF)助孕受精失败给生殖科医生带来了很大的困扰，并给不孕不育夫妇带来很大的心理及经济负担，为了挽救患者即将破灭的求子愿望，我院生殖中心对IVF后6 h无第二极体的成熟卵母细胞即IVF周期受精失败的的患者行补救ICSI。本研究通过对行补救ICSI助孕患者妊娠及未妊娠的男方精子DNA完整率、精子顶体完整率及反应率进行分析，探讨3者对补救ICSI妊娠结局的影响，并且通过3者可以提前预测补救ICSI的妊娠结局情况，根据预测情况选择适当的辅助生殖技术(行补救ICSI或直接行ICSI助孕)，有效降低周期取消率，并增加妊娠几率。

1 资料和方法

1.1 研究对象

本研究对2013年1月~2014年12月来广西壮族自治区人民医院生殖中心就诊的97对行补救ICSI治疗的不孕不育夫妇，根据妊娠情况分为妊娠组(41例)及未妊娠组(56例)。男性年龄在20~40岁，女性年龄在20~38岁；女方性激素及B超声检查示卵巢功能正常者。所有男性患者均需测定血清中性激素水平(卵泡刺激素，黄体生成素，睾酮)、精液常规、混合抗球蛋白反应、精子形态、精子DNA、精子顶体完整率及顶体反应率，以了解睾丸生精功能及精子功能质量。所有患者染色体核型检查均未见异常。本中心行IVF指征：女方各种因素导致的配子运送障碍，排卵障碍，子宫内膜异位症，男方少弱畸精子症，免疫性不孕与不明原因不孕。补救ICSI指征：所有受精胚胎在培养液中观察6 h后出现二极体的胚胎数量占总胚胎数<30%。

1.2 方法

1.2.1 精子处理 梯度加上游法：40%、80%梯度，200 g离心15 min，收集沉淀，用Givf混匀，再300 g离心5 min，沉淀上游液30 min，收集上清精子备用。精液处理前浓度：44.38±28.63×10^6/mL，PR：34.94±16.13(%)；精液洗涤后浓度：14.35±20.63×10^6/mL，PR：85.02±13.21(%)。

1.2.2 精子DNA完整性检测 IVF失败前精子DNA的检测采用精子染色质扩散试验，主要试剂有瑞氏-姬姆萨(珠海贝索生物技术有限公司)，上述处理后精子标本授精采用4孔皿，精子密度为5×10^5/mL，其中精子核DNA碎片的判断标准计数400个精子，观察精子光晕大小。根据光晕与精子头部横径的比例，粗分为大、中、小和无光晕4个等级，大和中光晕表示精子DNA完整无碎片，小和无光晕表示精子DNA断裂为碎片。小光晕以精子头直径≤1/4为判断标准；中光晕精子头直径>1/4，≤2/3；大光晕精子头直径>2/3。

1.2.3 精子顶体测定(IVF失败前)

1.2.3.1 试剂 PSA-FITC豌豆凝集素(SIGMA公司) 异硫氰酸荧光素FITC标记。

1.2.3.2 结果评估 用450~490 nm激发光，于400倍油镜下观察涂片。精子分类如下，顶体完整(AI)：精子头部一半以上荧光染色明亮且均匀；已发生顶体反应(AR)：精子仅在赤道带出现荧光带，或者在顶体区根本没有荧光染色；顶体异常：除上述两类精子外的所以其他精子。

1.2.3.3 已发生顶体反应精子的计数 运用实验室计数器，计数每种顶体类型(AI和AR)的数目。每张图片计数200个精子，以达到可接受的低取样误差；计算2张重复涂片已发生顶体反应精子百分率的平均值和差异；如果两个百分率之间得差异是可以接受的，报告已发生顶体反应精子的平均百分率。若差异较大，则重新评估2张涂片。

1.2.4 补救ICSI 对未排出Pb2的卵母细胞于授精6~8 h后再次观察，于当晚对未排出Pb2的卵母细胞行补救性ICSI[6]。

1.3 受精、卵裂、胚胎移植及妊娠情况

常规行补救ICSI，补救ICSI后第1天观察卵子受精情况，以双原核(2PN)卵子作为正常受精卵。第3天按照Peter分级标准选择优质胚胎进行移植，移植胚胎数≤3个，剩余Ⅲ级以上胚胎冷冻保存，并同时给于黄体支持。

1.4 妊娠及随访结局

移植术后第14、l8天若测血β-HCG阳性，第35天B超观察官腔内孕囊数目和心管搏动以确立临床妊娠。

1.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件，计量资料以均数±标准差表示；计数资料采用t检验；计量资料采用χ^2检验；DFI、精子顶体完整率、精子顶体反应率与胚胎卵裂率、受精率、优胚率采用Spearman等级相关测试。

2 结果

2.1 两组患者一般情况

男方年龄、睾酮值、睾丸体积、FSH值，女方年龄、获卵数差异无统计学意义(P>0.05)但不育年限未妊娠组高于妊娠组，差异有统计学意义(P<0.05，表1、2)。

2.2 两组患者行补救ICSI结局情况

妊娠组与未妊娠组行补救ICSI时受精率及卵裂率差异无统计学意义(P>0.05)，但优胚率妊娠组高于未妊娠组，差异有统计学意义(P<0.05，表2)。纳入研究97对不孕不育夫妇，行补救ICSI 97个周期，其中妊娠41个周期，临床妊娠率为42.3%；双活胎10例，双胎率为10.3%；单活胎31例，单胎率为32.0%。

表1 两组男性患者精液质量及一般情况

Tab.1 General clinical data and sperm quality of the male patients in the two groups

Groups	*n*	Age (years)	Testicular volume (mL)	Infertility (years)	Testosterone (ng/dL)	FSH (IU/L)	DFI (%)	Acrosomeintact rate (%)	Acrosomereaction rate (%)
Pregnancy	41	34.8±4.9	30.0±1.9	4.1±2.8	518.5±97.5	7.2±2.6	11.3±14.1	83.8±9.2	3.3±1.9
No pregnancy	56	36.0±5.9	29.8±2.1	5.5±3.8	522.3±83.1	7.1±2.4	15.9±18.7	77.0±18.9	4.5±4.3
t	-	-1.002	0.539	-2.077	-0.208	0.322	-1.307	2.231	-1.877
P	-	0.319	0.531	0.041△	0.836	0.748	0.195	0.028△	0.064

表2 两组患者女方因素及行补救ICSI情况

Tab.2 Female factors and data of rescue ICSI in the two groups

Groups	*n*	Age (years)	Eggs (*n*)	Fertilization rate (%)	Cleavage rate (%)	Good embryo rate (%)
Pregnancy	41	32.9±4.4	12.1±5.7	66.1±20.3	97.2±6.5	42.7±23.1
No pregnancy	56	33.3±5.1	10.0±5.9	63.1±21.3	95.9±12.4	27.7±4.1
t	-	-0.375	1.752	0. 704	0.666	2.734
P	-	0.708	0.083	0.483	0.507	0.007※

2.3 两组患者精子DNA完整率、顶体完整率、顶体反应率的情况

妊娠组精子DNA完整率(DFI)、顶体反应率差异无统计学意义(*P*>0.05);但顶体完整率妊娠组高于未妊娠组,差异有统计学意义(*P*<0.05,表1)。

2.4 精子DNA完整率、顶体完整率、顶体反应率分别与受精率、卵裂率、优胚率的相关性

精子DNA完整率分别与受精率、卵裂率、优胚率均无显著相关性(*P*>0.05),顶体完整率分别与受精率、卵裂率、优胚率均无显著相关性(*P*>0.05);顶体反应率分别与受精率、卵裂率、优胚率均无显著相关性(*P*>0.05,表3)。

表3 精子DNA完整率、顶体完整率、顶体反应率分别与受精率、卵裂率、优胚率的相关性分析

Tab.3 Correlation of DFI, acrosome integrity rate, and acrosome reaction rate with fertilization rate, cleavage rate, and good embryo rate

	Fertilization rate		Cleavage rate		Good embryo rate	
	r	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*
DFI	-0.024	0.017	-0.694	0.489	0.055	0.595
Arosome intact rate	0.193	0.058	0.095	0.357	0.011	0.914
Acrosome reaction rate	-0.072	0.482	0.037	0.720	0.011	0.914

3 讨论

由于卵母细胞及精子方面等因素,体外受精-胚胎移植过程中中的卵完全不受精或低受精等情况在所难免,补救ICSI作为解决该难题而被推广。补救ICSI常采用常规IVF后3 h加入精子,在精卵结合后6 h将卵周颗粒细胞清除。补救ICSI按补救时间的不同分为6 h补救ICSI(早期补救)和20 h补救ICSI(晚期补救)。早期补救ICSI可以在更早的时间内补救受精,避免卵子过度老化,与晚期补救ICSI相比,其优势在于受精率、优质胚胎率、5个细胞以上胚胎率更高,受精和胚胎发育情况更接近于常规ICSI,妊娠率明显高于晚期补救ICSI者,可冷冻的胚胎更多,累积妊娠率也增加,而异常受精率没有增加[7]。但是,晚期补救ICSI虽然仍可以受精,由于卵子老化,遗传异常增加,胚胎发育能力低,况且胚胎发育状况与子宫内膜不同步,所以妊娠率也很低[8]。

IVF受精障碍的发生率是10%~20%[1],研究报道不明原因性不孕是导致IVF受精失败的重要原因之一,不明原因不孕患者的精液质量符合或略低于WHO正常质量标准仍未达到行ICSI指征,但是可能存在着某些难以发现的功能障碍,如透明带-顶体反应缺陷[9],精子核染色质不成熟[10],可导致常规受精完全失败的风险增加。Zhu等[11]提出补救ICSI技术是一种解决完全受

精失败的有效方法,及早行补救ICSI技术可能会获得更好的临床妊娠率。Sermondade等[12]回顾性分析,17例行IVF受精失败后行补救ICSI发现冷冻周期每胚胎移植妊娠率要远高于新鲜周期(40.0% *vs* 6.7%),如果冷冻保持胚胎与子宫内膜同步发展的情况下可以提高补救ICSI技术的最终结局。

关于补救ICSI的应用仍存在争议,一部分学者提出了不同观点,IVF受精失败后行补救ICSI可以使卵细胞受精,由于胚胎发育潜能较差,所以IVF完全受精失败后行补救ICSI不推荐应用[1]。近来有研究提出[13]补救ICSI技术的结局令人不满意是因为较低的临床妊娠率,其中一个原因可能是胚胎发育阶段和子宫内膜不同步。因此,胚胎与子宫内膜同步发展被认为是影响补救ICSI技术结局的重要因素。根据临床各方面综合评估和胚胎发育情况可以预测补救ICSI周期是否成功,研究发现补救ICSI结局与年龄和高质量的胚胎相关,且完全受精失败后行补救ICSI从成本效益来评估是值得应用的[14]。本研究纳入97对不孕不育夫妇,行补救ICSI 97个周期,其中妊娠41个周期,临床妊娠率为42.3%;双活胎10例,双胎率为10.3%;单活胎31例,单胎率为32.0%。为此,笔者认为补救ICSI确实是完全受精失败后有效的补救措施,且不育年限短,优质胚胎率高有利于临床妊娠,结论与上述观点一致,这可能由于患者不孕不育年限较短,夫妇双方所承受的家庭、社会压力及精神刺激不算太重,男方精液质量尚可,并且精子DNA仍然较为完整,女方卵巢功能及子宫内膜情况较好,给精卵提供了一个较好的受精环境,有利于精子受精,可以得到较好的胚胎,从而增大了妊娠的几率。

精子DNA损伤是一个对辅助生殖结果的预测指标。据报道精子数量和精子的能动性与DNA完整性显著相关,此外,DNA完整性与白细胞介素-6和巨噬细胞显著负相关性,干扰DNA完整性可影响精卵交融,甚至影响ICSI受精率,并且早期流产与精子DNA损伤有关[15]。研究表明精子DNA基质附着区区域损伤与受精率降低、植入失败、流产、婴儿出生缺陷的关系仍存在争议[16-17]。Marchetti等[18]报道受精后,未修复的精子DNA为染色体结构畸变精子DNA机械修复可产生染色体异常的后代,这些发现强调受精前后DNA修复可以保证了孕体基因组的完整性。因此,我们建议不育男性应测试精子染色质结构分析(SCSA)作为精液分析的补充指标,研究发现[17]如果当DFI超过30%时,应行ICSI技术助孕。

精子DNA碎片用于辅助生殖技术过程可用来预测受精率、胚胎发展、妊娠率、精子DNA完整性与精液常规指数与行ICSI和IVF受精率呈正相关;行ICSI技术妊娠率与精子DNA碎片(DNA分裂指数)呈显著的负相关;由于DNA分裂指数超过15%时胚胎发育受阻,周期取消的风险增加、流产风险增加,因此行辅助生殖技术助孕前2~5个月检查精子DNA完整率可作为受精、妊娠、流产率和妊娠结局预测指标[19]。本研究发现补救ICSI妊娠组和未妊娠组精子DNA完整率无显著差异,这可能与两组患者精液质量及精子形态差异不大或者与本研究样本量不足相关。精子DNA完整率与受精率、卵裂率、优胚率无显著相关性。

顶体基质是一种不溶性结构在精子顶体作为支架并控制、释放与顶体基质相关蛋白在精子顶体发生反应,也与卵母细胞周围的透明带相互作用,尽管发生顶体反应被蛋白水解,仍能保持其稳定,这种稳定性的机制至今尚不明确。在受精过程中发生顶体反应是一个基本步骤,顶体膜和细胞质膜混合形成的囊泡在细胞外释放顶体酶,顶体酶上覆在精子头部,使精子穿透卵母细胞进行受精[20-21]。精子蛋白酶在顶体反应中使精子表面的胶状结构溶解释放精子活性物质,给精子供能[22]。本研究发现补救ICSI妊娠组和未妊娠组精子顶体反应率无显著差异,可能是两组患者顶体由于自身原因发生了自发反应导致精子顶体反应率差异不显著,也可能与纳入研究样本量不足有关。顶体反应率与受精率、卵裂率、优胚率无显著相关性。

精子顶体缺陷与男性不育密切相关,顶体完整率是反映顶体缺陷与否的重要指标。精子顶体不完整可导致男性不育,精子顶体完整率可作为评价精子功能的常规项目之一[23]。本研究发现行补救ICSI妊娠组精子顶体完整率高于未妊娠组,且顶体完整率高有利于补救ICSI妊娠结局,研究发现精子顶体完整率与精子活动率、精子浓度之间存在正相关性[24]。这可能是通常精子整体质量较好时精子顶体完整率及精子DNA完整率往往较高,精子顶体内存在顶体酶、透明质酸酶、酸性磷酸酶和ATP酶等,精子顶体完整更有利于精子经过透明带与卵子受精,提高了受精率,受精率提高后有利于提高优质胚胎率,最后有利于妊娠结局。但是,精子顶体完整率与受精率、卵裂率、优胚率均无显著相关性。

鉴于精子DNA完整率、精子顶体完整率及反应率与受精率、卵裂率、优胚率均无显著相关性,这可能是受精率、卵裂率、优胚率受多方面因素影响。男方因素包括精液质量、精子形态及不良生活习惯(如嗜烟酒、接触有害物质等)等,女方因素包括卵巢功能、内分泌情况、子宫内膜水平及外界环境等影响,另外可能本研究纳入样本量不足,导致精子DNA完整率、精子顶体完整率及反应率及妊娠情况相关性不显著。

本研究进一步阐明补救ICSI是体外受精-胚胎移植受精失败后有效的补救方案,不育年限短、精子顶体完整率及优胚率高有利于补救ICSI妊娠结局;精子DNA

完整率、顶体完整率、顶体反应率分别与受精率、卵裂率、优胚率均无显著相关性。现关于精子DNA完整率、顶体完整率及顶体反应率对补救ICSI结局影响的相关研究尚缺乏，仍需进一步研究。

参考文献：

[1] Kuczyński W, Dhont M, Grygoruk C, et al. Rescue ICSI of unfertilized oocytes after IVF[J]. Hum Reprod, 2002, 17(9): 2423-7.

[2] Payne D, Flaherty SP, Barry MF, et al. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography[J]. Hum Reprod, 1997, 12 (3): 532-41.

[3] 黄玉玲, 龙晓林, 刘见桥, 等. 体外受精-胚胎移植中完全受精失败的原因分析[J]. 生殖与避孕, 2011, 31(7): 455-8, 480.

[4] 朱丽霞, 席青松, 任新玲, 等. 对常规IVF未受精周期不同时间实施补救ICSI的比较[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(9): 1388-90.

[5] Singh N, Malhotra N, Shende U, et al. Successful live birth after rescue ICSI following failed fertilization[J]. J Hum Reprod Sci, 2013, 6(1): 77-8.

[6] Chen C, Kattera S. Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6 h post-insemination in conventional IVF[J]. Hum Reprod, 2003, 18(10): 2118-21.

[7] 王美仙, 邵小光, 张振强, 等. 不同时间补救ICSI结局的比较分析[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(7): 1047-9.

[8] Tsirigotis M, Nicholson N, Taranissi M, et al. Late intracytoplasmic sperm injection in unexpected failed fertilization *in vitro*: diagnostic or therapeutic?[J]. Fertil Steril, 1995, 63(4): 816-9.

[9] Liu DY, Baker HW. Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of *in vitro* fertilization in patients with unexplained infertility[J]. Fertil Steril, 2003, 79(1): 74-80.

[10] Katayose H, Yanagida K, Hayashi S, et al. Fertilization failure from a sperm chromatin defect in couples with unexplained infertility[J]. J Reprod Med, 2004, 49(9): 727-32.

[11] Zhu L, Xi Q, Nie R, et al. Rescue intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study[J]. J Reprod Med, 2011, 56(9/10): 410-4.

[12] Sermondade N, Hugues JN, Cedrin-Durnerin I, et al. Should all embryos from day 1 rescue intracytoplasmic sperm injection be transferred during frozen-thawed cycles[J]? Fertil Steril, 2010, 94 (3): 1157-8.

[13] Ming L,Liu P, Qiao J, et al. Synchronization between embryo development and endometrium is a contributing factor for rescue ICSI outcome[J]. Reprod Biomed Online, 2012, 24(5): 527-31.

[14] Shalom-Paz E, Alshalati J, Shehata F, et al. Clinical and economic analysis of rescue intracytoplasmic sperm injection cycles [J]. Gynecol Endocrinol, 2011, 27(12): 993-6.

[15] Gazo I, Shaliutina-Kolešová A, Dietrich MA, et al. The effect of reactive Oxygen species on motility parameters, DNA integrity, tyrosine phosphorylation and phosphatase activity of common carp (Cyprinus carpio L.) spermatozoa[J]. Mol Reprod Dev, 2015, 82 (1): 48-57.

[16] Lewis SE, John Aitken R, Conner SJ, et al. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment[J]. Reprod Biomed Online, 2013, 27(4): 325-37.

[17] Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome[J]. Hum Reprod, 2007, 22(1): 174-9.

[18] Marchetti F, Bishop J, Gingerich J, et al. Meiotic interstrand DNA damage escapes paternal repair and causes chromosomal aberrations in the zygote by maternal misrepair[J]. Sci Rep, 2015, 5 (7689): 7689.

[19] Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome[J]. Fertil Steril, 2007, 87(1): 93-100.

[20] Sosa CM, Pavarotti MA, Zanetti MN, et al. Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis[J]. Mol Hum Reprod, 2015, 21(3): 244-54.

[21] Guyonnet B, Egge N, Cornwall GA. Functional amyloids in the mouse sperm acrosome[J]. Mol Cell Biol, 2014, 34(14): 2624-34.

[22] Yokoe M, Sano M, Shibata H, et al. Sperm proteases that May be involved in the initiation of sperm motility in the newt, Cynops pyrrhogaster[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(9): 15210-24.

[23] 李大文, 孟繁华, 韩 伟. 精子顶体完整率对男性生育功能的影响[J]. 山东医药, 2010, 50(15): 71-2.

[24] 苏 昀, 周性明, 陈旬英, 等. 人精子顶体完整率的测定及其临床意义[J]. 江苏医药, 1999, 25(2): 103-4.

（编辑：吴锦雅）